

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3925 140 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 39 25 140.3
㉔ Anmeldetag: 28. 7. 89
㉕ Offenlegungstag: 7. 2. 91

⑤ Int. Cl. 5:
G 01 N 27/30

G 01 N 27/40
G 01 N 33/50
C 12 N 11/06
C 12 N 13/00
C 12 N 15/00
C 12 N 9/02
B 01 D 61/42
C 25 B 11/00

DE 3925 140 A 1

㉑ Anmelder:

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

㉒ Vertreter:

Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

㉓ Erfinder:

Kalisz, Henryk M., Dr.; Künnecke, Wolfgang, 3300
Braunschweig, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

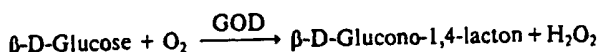
⑤④ Elektrode mit deglykosyliertem Glykoprotein-Enzym und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft eine Elektrode mit darauf immobili-
siertem deglykosylierten Glykoprotein-Enzym und deren
Verwendung.

DE 3925 140 A 1

Beschreibung

Das Flavoenzym Glucoseoxidase (GOD; β -D-Glucose: Oxygen Oxidoreductase, EC 1.1.3.4.) oxidiert β -D-Glucose zu D-Glukonolacton nach folgender Reaktionsgleichung:



Die Reoxidation des reduzierten Enzyms kann durch Sauerstoff oder mit Hilfe artifizierlicher Elektronenakzeptoren, sogenannte Mediatoren, wie Ferrocen, erfolgen; vgl. beispielsweise Anal. Chem., 56 (1984) 667. Ein direkter Elektronentransfer zwischen dem Aktiven Zentrum des Enzyms und einer Elektrode aus beispielsweise Gold, Platin oder Graphit ist nicht möglich. Das liegt daran, daß die Distanz zwischen dem Aktiven Zentrum und der Oberfläche des Enzyms größer als die Strecke ist, die die Elektronen pro Zeiteinheit zurücklegen können. Eine Wechselwirkung zwischen Enzym und Elektrode wird nur über Elektronenakzeptoren, wie Sauerstoff oder Ferrocen, möglich, die die Elektronen unter Reduktion aufnehmen und an der Elektrode wieder abgeben; vgl. beispielsweise J. Phys. Chem., 91 (1987), 1285.

Durch die relativ hohen Redoxpotentiale derartiger Verbindungen sind jedoch Störungen durch andere elektroaktive Substanzen nicht auszuschließen. Man strebt deshalb Messungen bei möglichst niedrigen Potentialen an. Kürzlich wurde eine direkte elektrochemische Kommunikation zwischen dem Aktiven Zentrum und der Elektrodenoberfläche durch chemische Modifikation des Enzyms erreicht; man vgl. J. Phys. Chem., 91 (1987), 1285 und J. Am. Chem. Soc., 110 (1988), 2615. Dazu wurden mehrere Ferrocenmonocarboxylat- bzw. Ferrocenacetat-Gruppen kovalent an GOD gebunden. Dadurch wurde die Wegstrecke für die Elektronen verringert, so daß das Enzym direkt an der Elektrode oxidiert werden konnte; vgl. J. Chem. Soc. Chem. Commun., (1987), 1603.

Entsprechende Überlegungen gelten für andere Glykoproteine unter Einschluß von Oxidasen, Oxygenasen und Oxidoreductasen für den Einsatz in diversen Elektronentransfer-Reaktionen, um die elektrochemische Kommunikation zwischen Enzym und Elektrode zu ermöglichen oder zu verbessern.

Erfindungsgemäß wird dazu eine Elektrode vorgeschlagen, die mit einem vollständig oder teilweise deglykosylierten Glykoprotein-Enzym kombiniert ist. Durch die Deglykolyse bzw. Entfernung des Kohlehydratanteils des Enzyms wird die Gesamtdistanz zwischen dem Aktiven Zentrum des Enzyms und der Elektrodenoberfläche verringert, so daß ein direkter Elektronentransfer zwischen Redoxzentrum und Elektrode ermöglicht wird, ohne daß die katalytische Aktivität aufgegeben wird. Damit wird man erfindungsgemäß von Mediatoren unabhängig.

Das Enzym kann auf der Elektrode oder auf einer mit der Elektrode kombinierten semipermeablen Membran immobilisiert sein oder in einer Kammer vorgesehen sein, die von der Elektrode und einer semipermeablen Membran gebildet wird.

Unter vollständig glykosylierten Glykoprotein-Enzymen werden solche Enzyme verstanden, die von Wildtyp-Mikroorganismen gebildet werden.

Die Deglykosylierung soll auf eine Weise erfolgt sein, daß die enzymatische Aktivität beibehalten ist. Unter dieser Bedingung kann die Deglykosylierung beispielsweise chemisch oder enzymatisch durchgeführt worden sein. Ferner kann das Enzym vollständig oder teilweise deglykosyliert gebildet worden sein, beispielsweise gentechnologisch; man vergleiche auch "Methods Enzymology", 138 (1987), 661–709.

Das deglykosylierte Glykoprotein-Enzym kann auf einer Elektrode immobilisiert worden sein, wie sie für elektrochemisch-enzymatische Oxidationen üblich ist, beispielsweise auf einer Elektrode aus Platin, Gold, Kohlenstoff oder einem elektrisch leitenden Polymeren. Die Elektrode kann jede beliebige Form aufweisen, also beispielsweise stabförmig oder flächig ausgebildet sein.

Beispielsweise kann eine Graphitelektrode oberflächlich oxidiert und danach mit Hilfe von Carbodiimid mit dem deglykosylierten Glykoprotein-Enzym versehen worden sein. Beispiele für immobilisierbare deglykosylierbare Glykoprotein-Enzyme sind Oxidasen, wie Glucoseoxidase (GOD; EC 1.1.3.4.), Oxygenasen und Oxidoreductasen.

Glucoseoxidase ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 160 kDa mit einem Kohlehydratanteil von 16% (Gewichtsbasis). Davon macht Mannose 90% aus. Der Zucker ist N-glykosidisch mit dem Stickstoffatom einer Asparagineinheit verknüpft; vgl. beispielsweise "Arch. Biochem. Biophys.", 111 (1965), 351. Diese Verknüpfung läßt sich enzymatisch oder chemisch aufheben; vgl. beispielsweise Beeley, Glycoprotein and Proteoglycan Techniques. In: Burdon & Knippenberg, "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Bd. 16, Elsevier, Amsterdam 1985. Die dort beschriebenen Deglykosylierung lassen sich auch auf andere erfindungsgemäß einsetzbare Glykoprotein-Enzyme übertragen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann man die deglykosylierten Glykoprotein-Enzyme auch ohne Immobilisierung für elektrochemisch-enzymatische Oxidationen von Substraten einsetzen. So ist es möglich, daß man das gewählte Enzym mit einer semipermeablen Membran, beispielsweise einer Dialysemembran, davon abhält, den Elektrodenraum zu verlassen.

Es versteht sich, daß man für diesen Einsatz ein deglykosyliertes Glykoprotein-Enzym verwendet, das einen Kohlehydratanteil aufweist, der gegenüber dem Kohlehydratanteil des vollständig glykosylierten Glykoprotein-Enzyms um mindestens 1, vorzugsweise mindestens 50 und insbesondere mindestens 95% verringert ist.

Zur Deglykosylierung und zum Typ der einsetzbaren Enzyme sei auf die vorstehenden Ausführungen verwiesen.

Nachstehend wird die Erfindung durch Beispiele und zwei Figuren näher erläutert.

Herstellungsbeispiel 1

Es wurde kommerzielle GOD bis zur Homogenität gereinigt und enzymatisch deglykosyliert. Dazu wurde das Enzym mit den Glykohydrolasen α -Mannosidase und Endoglykosidase H inkubiert. Bei gaschromatographischer Untersuchung ergab sich eine Abnahme des Kohlehydratanteils der GOD von mehr als 95% (Gewichtsbasis). Die Entfernung der Zuckerkette verringerte das Molekulargewicht der GOD um 25% (SDS) bzw. 30% (native PAGE). Das Enzym verlor praktisch keine Aktivität. Die Stabilität der deglykosylierten GOD war ebenfalls unbeeinträchtigt. Allerdings waren die K_m - und k_{cat} -Werte verändert; man vgl. Tabelle 1.

SDS = Natriumdodecylsulfat
PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese

Tabelle 1

Kinetische Parameter der deglykosylierten GOD im Vergleich zum nativen Enzym

Glucose-Oxidase	K_m [mM]	k_{cat} [S^{-1}]	Spezifische Aktivität [U/mg] (100 mM)	(V_{max})
Nativ (hochgereinigt)	28	1200	310	458
Deglykosyliert	35	620	235	371

Die Affinität der deglykosylierten GOD für β -Glucose war geringer als die der nativen GOD, wobei die Substratspezifität allerdings erhalten blieb. Die pH- und Temperatur-Optima blieben gleich, auch die Stabilität des Enzyms zeigte keine Veränderungen.

Danach wurden Graphitstäbe (Durchmesser 5 mm und Länge 50 mm; RW-O, Ringsdorff-Werke, Bad Godesberg) in einer Oxidationslösung mit einem Gehalt an 10% Salpetersäure (Volumenbasis) und 2,5% Kaliumdichromat (Gewicht/Volumen) bei +2,3 Volt elektrochemisch 30 s lang oxidiert. Als Kathode diente ein Platinnetz. Nach intensivem Waschen mit Wasser oder einer Pufferlösung waren die Elektroden zur Weiterverarbeitung geeignet.

Die deglykosylierte GOD wurde mit Hilfe der Carbodiimid-Methode auf den Graphitelektroden immobilisiert. Dazu wurden die Elektroden in einer Lösung von 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat in Acetatpuffer (pH 5,5) 90 min lang stehengelassen. Nach sorgfältigem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Elektroden dann in folgende Enzymlösungen gestellt:

- gereinigte GOD aus *Aspergillus niger*,
- deglykosylierte GOD aus *Aspergillus niger* bzw. *Penicillium amagasakiense*.

Die Elektroden wurden in diesen Lösungen bei 4°C über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und waren nach mehrmaligem Spülen mit dem Puffer gebrauchsfertig.

Beispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1

Amperometrische Messungen: Die Strom/Zeit-Kurven wurden mit einem 3-Elektroden-System aufgenommen, das aus Arbeitselektrode (Enzymelektrode), Hilfselektrode (Platindraht; Durchmesser 0,46 mm) und Referenzelektrode (Ag/AgCl) bestand, die in einem 20-ml-Glasgefäß in entgastem Acetatpuffer (100 mM, pH 6,0) angeordnet waren. Bei allen Messungen wurde mit einem Magnetprüher gerührt und auf 25°C thermostatisiert. Die Elektroden wurden mit einem Präzisions-Potentiostaten (Wenking LB 75 L, Firma Bang, Göttingen) polarisiert, und der resultierende Strom wurde auf einem Flachbettschreiber aufgezeichnet. Alle Potentialangaben wurden auf die Ag/AgCl-Elektrode bezogen.

Ergebnisse: Die deglykosylierte GOD ermöglichte Glucosebestimmungen bei Potentialen um 0 Volt (vs. Ag/AgCl).

In Fig. 1 ist der Stromanstieg an einer Elektrode mit deglykosylierter GOD im Vergleich zu einer Elektrode mit hochgereinigter GOD dargestellt. Beide Elektroden wurden bei 0 Volt polarisiert. Nach der Stabilisierung des Signals wurde GOD-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben und der resultierende Strom aufgezeichnet. Die deglykosylierte GOD zeigte trotz der verlangsamten Kinetik des Enzyms (siehe Tabelle 1) eine deutlich höhere Stromausbeute.

Beispiel 2

Auch nicht-immobilisierte deglykosylierte GOD kann für Enzymelektroden eingesetzt werden. So wurde in diesem Beispiel deglykosylierte GOD vor einer Platinelektrode mit Hilfe einer Dialysemembran eingeschlossen. Fig. 2 zeigt die Glucose-Sättigungskurve der Elektrode. Im Vergleich zum immobilisierten Enzym auf Graphit (Fig. 1) fallen die niedrigen Ströme dieser Elektrode auf.

Patentansprüche

1. Elektrode mit in Kombination mit einem vollständig oder teilweise deglykosylierten Glykoprotein-Enzym.
2. Elektrode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym auf der Elektrode oder auf einer mit der Elektrode kombinierten semipermeablen Membran immobilisiert ist oder in einer Kammer vorgesehen ist, die von der Elektrode und einer semipermeablen Membran gebildet wird.
3. Elektrode nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym enzymatisch deglykosyliert worden ist.
4. Elektrode nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym gegenüber dem Wildtyp-Enzym nicht oder nicht vollständig glykosyliert gebildet worden ist, beispielsweise auf gentechnologischem Wege.
5. Elektrode nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Elektrode um eine Graphitelektrode handelt.
6. Elektrode nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit Hilfe von Carbodiimid auf der gegebenenfalls zuvor oberflächlich oxidierten Graphitelektrode immobilisiert werden ist.
7. Elektrode nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch deglykosylierte Glucoseoxidase als deglykosyliertes Glykoprotein-Enzym.
8. Verwendung der Elektrode zur enzymatischen Oxidation von Substraten.
9. Verwendung von vollständig oder teilweise deglykosyliertem Glykoprotein-Enzym bei der elektrochemisch-enzymatischen Oxidation von Substraten.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man ein deglykosyliertes Glykoprotein-Enzym verwendet, dessen Kohlehydratanteil gegenüber dem Kohlehydratanteil des vollständig glykosylierten Glykoprotein-Enzym um mindestens 1%, vorzugsweise mindestens 50% und insbesondere mindestens 95% verringert ist.
11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man ein deglykosyliertes Glykoprotein-Enzym benutzt, das enzymatisch deglykosyliert worden ist.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man deglykosylierte Glucoseoxidase als deglykosyliertes Glykoprotein-Enzym verwendet.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

— Leerseite —

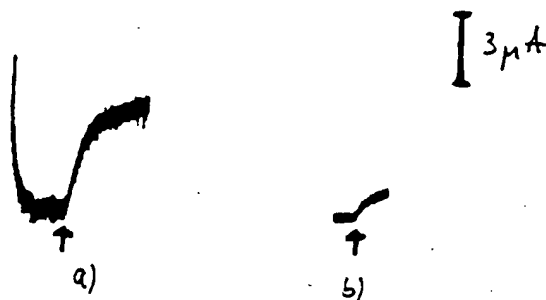


Abb. 1 Antwortsignale auf Glukose bei 0 V. Vergleich (a) deglykosylierter Glukoseoxidase mit (b) nativer GOD immobilisiert auf Graphit-Elektroden. (Pfeil = Zugabe von Glukose).

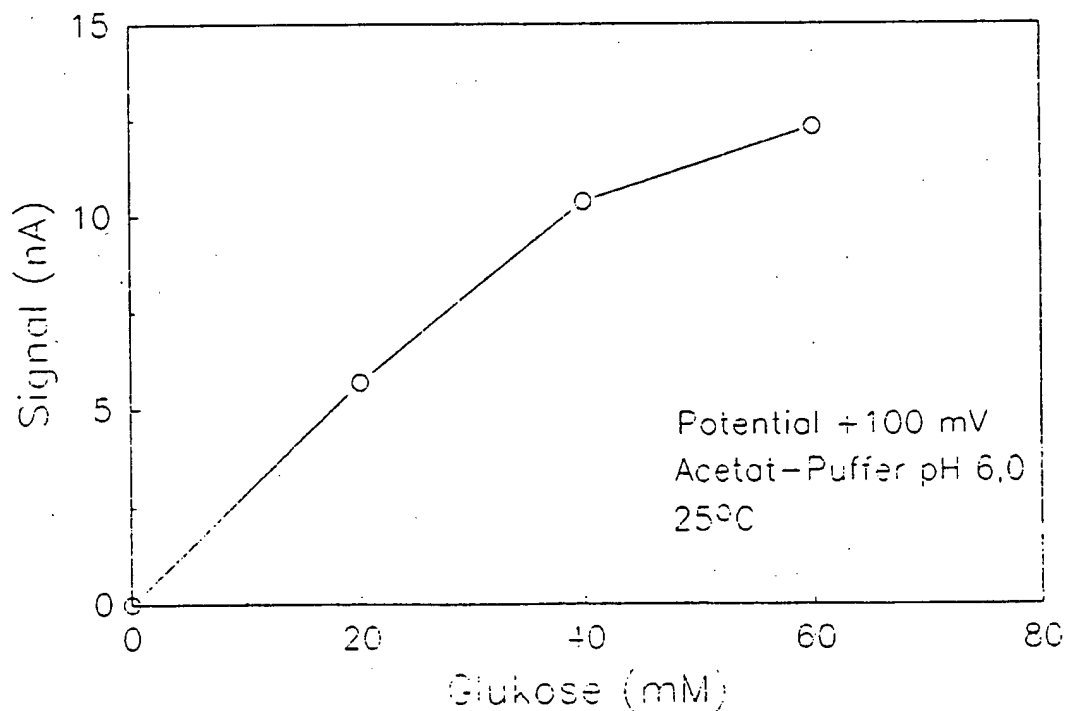


Abb. 2 Sättigungskurve einer Glukose-Elektrode mit deglykosylierter GOD bei +100 mV.